

Sialylated Milk Oligosaccharides as Regulators of Mucosal Immunity

Dissertation

zur

**Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde
(Dr. sc. nat.)**

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

Ekaterina Kurakevich

aus

Russland

Promotionskomitee

Prof. Dr. Thierry Hennet (Vorsitz)

PD Dr. Lubor Borsig (Leitung der Dissertation)

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler

Prof. Dr. Roland Wenger

Zürich, 2012

Table of contents

Summary	6
Zusammenfassung	7
List of abbreviations	9
Introduction	11
Mucosal immune system of the gastrointestinal tract	13
Anatomy of the intestinal immune system	13
Innate and adaptive regulation of intestinal immunity	14
Intestinal epithelial cells – barrier function	14
Intestinal mucins – passive protection	15
Antimicrobial peptides – active protection	17
Innate immune cells	18
How antigen sensing works: PRRs	19
Adaptive immune cells	23
Gut microbiota and the immune system	25
Tolerance	27
Breaking of tolerance: IBD	28
Early nutrition and the immune system	30
Breastfeeding - a “golden standard” for infant nutrition	30
Human milk oligosaccharides and their functions	33
Glycosylation and the immune system	37
Sialylation	38
Sialic acid and immune cells	38
Sialic acid and microorganisms	39
The aim of the study	41
References	42
Results	55
Manuscript 1: Milk oligosaccharide sialyl(α2,3)lactose activates intestinal	
CD11c⁺ cells through TLR4 and triggers intestinal inflammation	57
Authors contributions	58
Abstract	59

Introduction	60
Results	62
Discussion	66
Acknowledgements	68
Materials and methods	69
References	71
Figure legends	74
Figures	76
Supplemental Data	83
Manuscript 2: Sialylation by <i>St3gal4</i> triggers T_H1/T_H17-driven chronic	
DSS-induced intestinal inflammation	97
Authors contributions	98
Abstract	99
Introduction	100
Results	102
Discussion	104
Materials and methods	106
References	108
Figure legends	110
Figures	112
Additional data	117
Discussion	121
Microbiota hypothesis	125
Immune cell hypothesis	126
References	131
Acknowledgments	135
Curriculum vitae	137

Summary

The mucosal immune system acts as the first line of defense against invading microorganisms. Improper development of mucosal immunity accounts for susceptibility of a person to various diseases. A key role in maturation and modulation of mucosal immunity is attributed to maternal milk. Breastfed infants have a lower incidence of diarrheal diseases and respiratory tract infections when compared to those raised on infant formulas. Moreover, the emerging evidence points to the long-term protective action of breastfeeding in relation to chronic disorders in adults. Many components including secretory IgA, bioactive proteins, lipids and oligosaccharides account for the beneficial effects of human milk. Oligosaccharides act as soluble receptors for different pathogens, thereby limiting pathogen dissemination in the gastrointestinal tract of infants. Milk oligosaccharides also act as prebiotics promoting colonization of beneficial bacteria in the gut. However, the contributions of individual maternal milk oligosaccharides to regulation of the mucosal immune system are still vague. The limited structural diversity of mouse milk oligosaccharides, consisting only of sialyl(α 2,3)lactose (3SL) and sialyl(α 2,6)lactose (6SL), simplifies characterization of the specific contribution of these molecules to intestinal homeostasis.

In the present study we investigated the role of 3SL in development of mucosal immunity in connection with chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. We based our study on *St3gal4*^{-/-} mice that lack 3SL in milk and have reduced α 2,3-sialylation in the gut in two mouse models. In the first model we induced chronic intestinal inflammation in wild-type (C57Bl/6) and *St3gal4*^{-/-} mice by dextran sulfate sodium treatment. In the second model we assessed the contribution of 3SL to spontaneous colitis development in *Il10*^{-/-} mice crossed into a *St3gal4*^{-/-} background. We showed that the progression of chronic colitis was delayed in the absence of *St3gal4* in both models. Exposure of newborn mice to milk-derived 3SL increased susceptibility to colitis in adulthood, while exclusion of 3SL from maternal milk reduced inflammation. Similarly, postnatal supplementation with pure 3SL resulted in enhanced development of colitis in mice. Moreover, short-term supplementation of pure 3SL to the adult *Il10*^{-/-} mice dramatically aggravated colitis pointing to the ability of the trisaccharide to directly modulate the mucosal immune system. We found that 3SL but not 6SL was a potent activator of CD11c⁺ dendritic cells that facilitated differentiation of T-cells towards T_H1 and T_H17 phenotype. The absence of 3SL-stimulation in *Tlr4*-deficient dendritic cells indicated that sensing of the trisaccharide occurs through the TLR4-signaling pathway. Collectively, our study demonstrated the important role of milk-derived 3SL in development of mucosal immunity and intestinal homeostasis.

Zusammenfassung

Das adaptive Immunsystem ist in den Schleimhäuten die primäre Immunabwehr gegen eindringende Keime. Eine ungenügende Entwicklung dieses adaptiven Immunsystems korreliert mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Krankheiten. Muttermilch spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Regulierung dieses adaptiven Immunsystems. Bei von Müttern gestillten Kindern treten Durchfallerkrankungen und Infektionen der Atemwege seltener auf als bei Kindern die mit auf Milchpulver basierten Produkten ernährt wurden. Immer mehr Daten deuten darauf hin, dass Muttermilch eine Langzeitschutzwirkung vor chronischen Krankheiten im Erwachsenenalter bietet. Die positive Wirkung von Muttermilch kann auf verschiedenste Inhaltsstoffe, wie etwa sekretiertes IgA, bioaktive Proteine, Lipide und Oligosaccharide zurückgeführt werden. Oligosaccharide fungieren als lösliche Rezeptoren für verschiedene Pathogene und limitieren damit deren Ausbreitung im Körper von gestillten Kindern. Zudem verhalten sich diese Moleküle als Präbiotika, welche die Ansiedlung von symbiotischen Bakterien im Darm fördern und damit indirekt die Ausbreitung von Pathogenen verhindern. Der Wirkmechanismus von in Muttermilch enthaltenen Oligosacchariden auf die Regulation des adaptiven Immunsystems in den Schleimhäuten ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die geringe strukturelle Diversität von Milcholigosacchariden, welche nur aus Sialyl(α 2,3)laktose (3SL) und Sialyl(α 2,6)laktose (6SL) aufgebaut sind, vereinfacht die Charakterisierung ihren spezifischen Beiträgen zur Darmhomöostase.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Rolle der 3SL auf die Entwicklung des adaptiven Immunsystems in Verbindung mit chronischen-entzündlichen Darmerkrankungen. Wir verwendeten in zwei verschiedenen Experimentalmodellen *St3gal4*^{-/-} Mäuse, deren Milch keine 3SL enthält und deren Darm eine reduzierte α 2,3-Sialysierung aufweist. Im ersten Modell wurden Wildtyp (C57Bl/6) und *St3gal4*^{-/-} Mäusen Natrium-Dextransulfat über das Trinkwasser gegeben und dadurch eine chronische Darmentzündung induziert. Im zweiten Modell wurde der Beitrag von 3SL in *IL10/St3gal4* Doppelknockout-Mäusen, welche eine spontane Darmentzündung ausbilden, gemessen. Wir haben gezeigt, dass die Entwicklung von chronischen Darmentzündungen ohne *St3gal4* in beiden Mausmodellen signifikant verlangsamt ist. Wurde neugeborenen Mäusen natürliches, in Milch enthaltenes 3SL oder künstliches 3SL zugeführt, nahm die Anfälligkeit für Kolitis im Alter zu. Im Gegenzug führte die Gabe von 3SL-freier Muttermilch zu einer Entzündungsreduktion. Ausserdem verschlimmerte die kurzfristige Gabe von 3SL an ausgewachsene *IL10*^{-/-} Mäuse dramatisch deren Kolitis. Dies deutet darauf hin, dass die Trisaccharide das Immunsystem direkt beeinflussen können. Zusätzlich zeigten wir, dass 3SL jedoch nicht 6SL ein potenter Aktivator von CD11c⁺ Dendritische Zellen ist. Diese Zellen vereinfachen die Differenzierung von T-Zellen in den T_H1 und T_H17 Phänotyp. Dendritischen Zellen ohne TLR4 werden durch 3SL nicht stimuliert, was darauf hindeutet, dass diese Trisaccharide über den TLR4 Signalweg detektiert werden. Zusammenfassend hat unsere Studie

die zentrale Rolle von 3SL in der Entwicklung des adaptiven Immunsystems und Darmhomöostase aufgezeigt.